

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**



**Vliv kyseliny nikotinové na expresi eNOS v aterosklerotických plátech**  
**arteria brachiocephalica**

**The effect of nicotinic acid on the expression of eNOS in**  
**atherosclerotic lesions in brachiocephalic artery**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce  
Hradec Králové 2013

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.  
Olga Svobodová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá použitá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

„Tímto bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD., za odbornou spolupráci, poskytování cenných rad a přátelskou atmosféru při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala celé mé rodině, která se mnou měla trpělivost a povzbuzovala mě.“

## Obsah

1. Abstrakt .....	6
2. Abstract.....	7
3. Úvod .....	8
4. Mikroskopická anatomie cév.....	9
4.1 Základní stavba cév.....	9
4.2 Arterie.....	11
4.3 Vény.....	11
4.4 Kapiláry.....	12
5. Endotel.....	13
5.1 Stavba a funkce endotelu.....	13
5.2 Dysfunkce endotelu.....	15
6. Ateroskleróza.....	18
6.1 Epidemiologie aterosklerózy.....	20
6.2 Patogeneze aterosklerózy.....	20
6.2.1 Patologické působení lipoproteinů.....	21
6.2.2 Patologické působení endotelu.....	22
6.2.3 Patologické působení monocytů a makrofágů.....	22
7. Myší model aterosklerózy.....	24
7.1 LDL-receptor deficientní kmeny.....	25
7.2 Apo-E deficientní a LDL-receptor deficientní kmeny.....	26
8. Kyselina nikotinová.....	27
8.1 Mechanismus účinku.....	27
8.2 Indikace.....	27
8.3 Nežádoucí účinky.....	28
8.4 Extrahypolipidemické účinky.....	28
8.5 Kontraindikace.....	28
9. Endoteliální NO syntáza.....	29
10. Princip imunohistochemie.....	30
11. Experimentální část.....	31
11.1 Cíl práce, Zadání.....	31
11.2 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu.....	31

11.3 Imunohistochemie (IHC).....	32
11.3.1 Protilátky.....	32
11.3.2 Roztoky a činidla.....	32
11.3.3 Postup práce při metodě ABC .....	32
11.4 Stereologická analýza.....	34
11.5 Statistická analýza.....	34
12 Výsledky.....	35
12.1 Biochemická analýza.....	35
12.2 Imunohistochemická analýza.....	35
12.3 Stereologická analýza exprese eNOS v arteriabrachocephalica..	38
13 Diskuze.....	39
14 Závěr.....	41
15 Seznam zkratk.....	42
16 Seznam použité literatury.....	44

# 1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Posluchač: Olga Svobodová

Název diplomové práce: Vliv kyseliny nikotinové na expresi eNOS v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo nastavit metodiku na detekci exprese eNOS v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica. Sledovali jsme také případné změny exprese eNOS po podávání kyseliny nikotinové.

Metoda: Ve studii jsme použili APO-E/LDLR- deficientní kmeny myší, které byly rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina krmena LCHP stravou (kontrolní skupina) a druhá skupina krmena LCHP dietou spolu s kyselinou nikotinovou. Tato dieta byla myším podávána po dobu 4 týdnů. Provedli jsme biochemickou analýzu, kterou byla určena hladina celkového cholesterolu u myší, dále pak imunohistochemickou detekci eNOS u obou skupin (LCHP a LCHP + kyselina nikotinová) na 96 sklíčkách. Pro detekci exprese eNOS jsme použili metodiku s avidin-biotin komplexem (ABC) a vizualizací pomocí diaminobenzidinu (DAB).

Výsledky: Biochemická analýza neprokázala významné rozdíly v hladinách cholesterolu mezi kontrolní skupinou a skupinou LCHP + nikotinová kyselina. Imunohistochemická detekce exprese eNOS byla nalezena u obou skupin a všech jejich zástupců. Zásadní rozdíly v expresi eNOS mezi skupinami LCHP a LCHP + kyselina nikotinová jsme nepozorovali.

Závěr: Imunohistochemická a stereologická analýza neukázala statisticky významné rozdíly mezi endoteliální expresí eNOS po léčbě kyselinou nikotinovou a u myší, které kyselinou nikotinovou léčeny nebyly. Toto poukazuje na fakt, že je potřeba se zaměřit na změnu designu studie.

## 2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Department of Biological and Medicinal Sciences

Consultant: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Student: Olga Svobodová

Title of Thesis: The effect of nicotinic acid on the expression of eNOS in atherosclerotic lesions in brachiocephalic artery

Background: The aim of this diploma thesis was to set methods for the detection of eNOS in brachiocephalic artery in mice fed by LCHP diet and LCHP diet containing nicotinic acid.

Methods: We used apoE/LDLR-deficient mice divided into two groups. The first group (control group) was fed by LCHP diet and the second group was fed by LCHP + nicotinic acid. Mice were fed this diet for four weeks. We performed a biochemical analysis of blood by measuring levels of total cholesterol in mice, and immunohistochemical detection of eNOS in both groups (LCHP and LCHP + nicotinic acid) in 96 slides. Detection of expression of eNOS was performed by avidin-biotin method (ABC) with visualization by diaminobenzidin (DAB).

Results: Biochemical analysis did not show significant changes in total cholesterol in mice treated with LCHP + nicotinic acid in comparison with control mice. Expression of eNOS was observed in all mice.

Conclusions: Immunohistochemical and stereological analysis showed no significant changes of endothelial expression of eNOS after nicotinic acid treatment when compared to non-treated mice suggesting that changes of experimental design will be necessary.

### 3 Úvod

Onemocnění kardiovaskulárního systému (KVO) zařazujeme dle epidemiologie mezi civilizační choroby. Světová zdravotnická organizace (WHO) označuje KVO za nejčastější příčinu úmrtí tzv. západní civilizace. Ročně zemře na KVO téměř 4,5 milionu obyvatel. Progrese onemocnění kardiovaskulárního systému je typická po padesátém roce života. Ženy bývají postiženy méně často než muži. Jsou chráněny estrogény, které se podílejí na snížení celkové hladiny cholesterolu a tím rizika onemocnění snižují. V roce 2011 zemřelo na KVO 46,81% mužů a 53,53% žen (1).

Mezi KVO řadíme hned několik nemocí: vrozené a získané srdeční vady, ischemickou chorobu srdeční (ICHS), hypertenzi, cévní mozkovou příhodu (CMP), záněty žil, ischemickou chorobu dolních končetin (ICHDK), chronickou žilní nedostatečnost a kardiomyopatie (2).

Nejčastější příčinou KVO je ateroskleróza. Jedná se o dlouhodobě se vyvíjející onemocnění cévní stěny, které se projevuje tvorbou aterosklerotických plátů. Dochází k zúžení průsvitu tepny a mohou ji zcela uzavřít pro průchod krve. Může postihnout cévy kdekoli na těle, většinou se však její důsledky nejzávažněji projevují v místech, kde jde o krevní zásobením životně důležitých orgánů. Onemocnění je po řadu let bezpříznakové (3).

Neovlivnitelné rizikové faktory aterosklerózy jsou takové, se kterými se jedinec rodí nebo je není schopen sám či s lékařskou pomocí změnit. Patří mezi ně věk, pohlaví (mužské) a rodinná anamnéza. Mezi ovlivnitelné rizikové faktory vzniku aterosklerózy řadíme ty, které se dají eliminovat nebo alespoň minimalizovat jejich působení změnou životního stylu nebo farmakologicky. Takových je celá řada. Mezi nejvýznamnější patří hyperlipidémie, arteriální hypertenze, kouření cigaret, diabetes mellitus II, nedostatek pohybu a obezitu (4).



## 4 Mikroskopická anatomie cév

Hlavní funkcí cévního řečiště je rozvod okysličené krve tkáním a přívod odkysličené krve z tkání zpět do plic. Dle velikosti a typu rozlišujeme tři základní cévy

Arterie

Vény

Kapiláry (5).

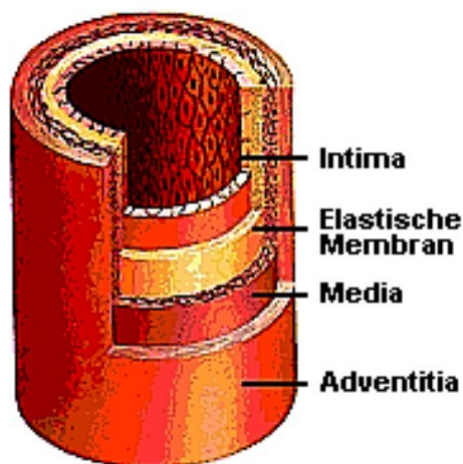
### 4.1 Základní stavba cév

V mnoha ohledech se stavby různých cév liší, nicméně základní strukturální znaky jsou stejné. Základní vrstvy, které tvoří stěnu cévy:

Tunica intima

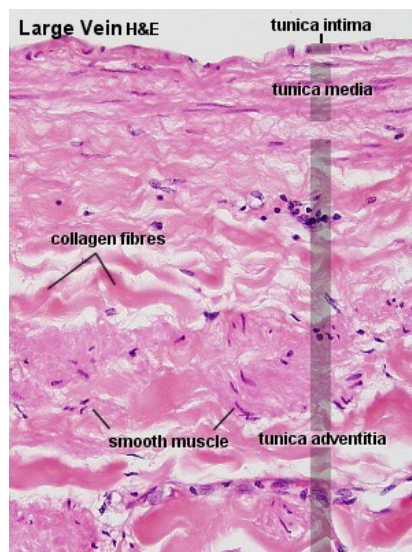
Tunica media

Tunica adventitia (6).



Obrázek 1: Cévní stěna

[http://eurogene.open.ac.uk/gallery2/v/Arterie\\_93.jpg.html](http://eurogene.open.ac.uk/gallery2/v/Arterie_93.jpg.html) (15. 4. 2013)



**Obrázek 2: Mikroskopická stavba cévní stěny**

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/vascular/vascular.htm> (19. 4. 2013)

### **Tunica intima**

Je vrstva cévy, která je v bezprostředním styku s krví. Skládá se z jedné vrstvy plochých endotelových buněk podložených sítí elastických a kolagenních vláken. Na větších cévách je ještě mezi endotel a elastická vlákna vložena tenká vrstvička vaziva. Od média je intima oddělena vnitřní vrstvou složenou z elastinu a fenestrovaných otvorů, které slouží pro průchod živin. Nazývá se membrána elastica interna (6).

### **Tunica media**

Střední vrstva cévní stěny se jmenuje tunica media. Je nejsilnější z vrstev stěny tepny. Skládá se z hladké svaloviny a sítě kolagenních a elastických vláken. Podle velikosti tepny převažuje svalová nebo elastická složka. Proto se označují jako tepny svalového či elastického typu. Velké tepny jsou typu elastického, u menších přibývá svaloviny. Elastické tepny se při systole rozpínají a při diastole se vracejí do původního stavu. To má vliv na pohánění krve a na rovnovážné proudění. Od vnější vrstvy, tunica adventitia, je oddělena tenkou vrstvou membrána elastica externa (6).

### Tunica adventitia

Vnější vrstva cévy je tvořena z fibrilárního vaziva s kolagenními a elastickými vlákny, které se na povrchu cévy síťovitě překřičují a přecházejí do vaziva v nejbližším okolí cévy. Tím ji pružně fixují k okolí(6).

## 4.2 Arterie

Arterie rozdělujeme na základě velikosti a podle zastoupení svaloviny a elastických vláken. Dle velikosti je dělíme na nejmenší arterioly, střední a větší arterie a arterie velkého kalibru (6).

Typ arterie	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
<b>Velké arterie (např. aorta)</b>	Silná, na povrchu endotelové buňky	Hladkosvalové buňky obklopeny elastickými vlákny	Tenká vrstva
<b>Střední svalové arterie (např. arteria mesenterica superior)</b>	Užší než u velkých arterioli, dobře vyvinutá membrana elastica interna	Velké zastoupení hladkosvalových buněk, až 40vrstev	Tenká vrstva
<b>Arterioly (úzké s průsvitem 0,1-0,05mm)</b>	Typické endotelové buňky	Hladkosvalové buňky tvoří 3-4 vrstvy	Tenká vrstva
<b>Metaarterioly (malé větve arterioli)</b>	Bez membrana elastica interna a subendotelu	Hladkosvalové buňky tvoří jednu vrstvu	Nesouvislá tenká vrstva, špatně rozlišitelná od medie

Tabulka 1: Typy artérií (6).

## 4.3 Vény

Základní stavba vén a artérií je shodná. Liší se ovšem v tloušťce stěny. U vén je stěna tenčí a flexibilnější s nižším množstvím svalových buněk a větším množstvím

kolagenních vláken. Z toho důvodu obsahují vény chlopně, které usměrňují tok krve a zabraňují městnání krve (7).

Typy vén	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
<b>Velké vény (např. vena cava superior)</b>	Dobře vyvinutá subendotelová vrstva s chlopněmi	Několikavrstevná, tvořená retikulárními a kolagenními vlákny	Je nejsilnější, obsahuje kolagenní vlákna a longitudinální hladkosvalové buňky
<b>Malé a střední vény (1-9mm, např. vena portae)</b>	Endotel a nekonstantní subendotelová vrstva, intima vytváří chlopně	Medie je tenká, tvořená hladkosvalovými buňkami, retikulárními a kolagenními vlákny	Je nejtlustší, obsahuje elastická a kolagenní vlákna, občas i hladkosvalové buňky
<b>Venuly (0,2-1mm)</b>	Tvořená pouze endotelem	1-3 vrstvy hladkosvalových buněk	Řídké kolagenní vazivo, je nejmohutnější

Tabulka 2: Typy vén (8).

#### 4.4 Kapiláry

Kapiláry jsou tenkostěnné cévy, které spojují vény a arterie. Průměr činí 5 – 20 µm. Stěna kapiláry je tvořena jednovrstevným epitelem, skrze který prostupují živiny, voda, dýchací plyny a produkty metabolismu z krve do tkání a z tkáně do krve. Kapiláry rozdělujeme na 3 základní typy:

Kapiláry sinusoidní

Kapiláry fenestrované - viscerální

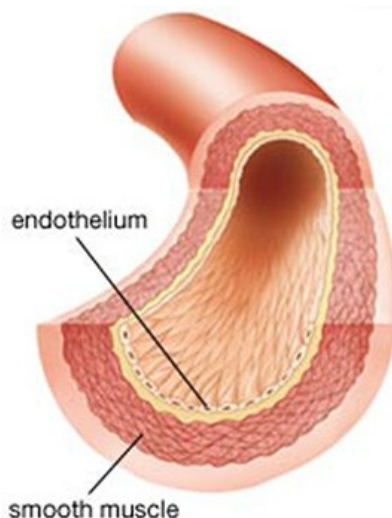
Kapiláry se souvislou výstelkou – somatické (9).

## 5 Endotel

Hlavní podíl v regulaci funkce cévního systému a v patogenezi KVO má endotel. Právě endoteliální dysfunkce je nejčastějším projevem poruchy funkce endotelu. Endoteliální dysfunkce vzniká vlivem rizikových faktorů, jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, kouření a diabetes mellitus. Při dlouhodobém působení vedou tyto faktory k poruše funkce endotelu. Stěna cévy se tak stává více propustná a vzniká nerovnováha mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy. Endoteliální dysfunkce tak hraje podstatnou roli v rozvoji vzniku aterosklerózy (10).

### 5.1 Stavba a funkce endotelu

Cévní endotel se skládá z jednovrstevného dlaždicového epitelu a vystýlá lumen cév (Obrázek č. 3). Jádra buněk jsou oploštělá a uložena uprostřed buněk. Hlavní funkcí endotelu je transport látek přes cévní stěnu, regulace cévního tonu a propustnosti, funkce koagulačních procesů (11).



Obrázek 3: Endotel

<http://histologyolm.stevegallik.org/node/209> (16. 4. 2013)

#### 1. Regulace cévního tonu

Pomocí vasodilatačních a vazokonstrikčních látek udržuje endotel cévní tonus. Mezi vasodilatační látky patří v první řadě oxid dusnatý (EDRF/NO). Ten ale není jediným vasodilatátorem v endotelu. Dalšími zástupci jsou například bradykinin

nebo prostacyklin (PGI<sub>2</sub>). Na straně druhé endotel obsahuje i látky vasokonstrikční. Hlavní látkou s tímto účinkem je endotelin – 1. Stejnou funkci zastávají i tromboxan A<sub>2</sub>, acetylcholin a angiotensin II. Při endoteliální dysfunkci dochází k snížené syntéze oxidu dusného a zvýšené produkci vasokonstriktorů. Tím nastává porucha funkce vasodilatace (11).

## **2. Ovlivnění struktury cévní stěny**

Endotel vytváří látky, které mají účinek buď růst stimulující, nebo růst inhibující. Při zvýšeném mechanickém napětí v cévní stěně dochází k syntéze růstových faktorů, které mají růst stimulující efekt na hladkosvalové buňky a endotel. Mezi látky s tímto účinkem patří hlavně PDGF (růstový faktor tvořený destičkami) a IGF-1 (inzulínu podobný růstový faktor). Stejně působí i endotelin-1 a angiotensin II. Látky s opačným charakterem účinku, čili růst inhibující působky jsou EDRF/NO, prostacyklin a TGF- $\beta$  (11, 12).

## **3. Antitrombotické a fibrinolytické vlastnosti**

Při správné funkci tvoří buňky endotelu uvnitř cévy nesmáčivý povrch, který udržuje rovnováhu mezi trombolýtickým a fibrinolytickým působením faktorů. Látky s antitrombotickým působením, EDRF/NO a prostacyklin, zabraňují účinku agregace a adheze trombocytů. Mají tedy antikoagulační aktivitu, jejíž účinek spočívá ve tvorbě bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a v produkci antikoagulačně působícího heparan sulfátu a trombomodulinu. Opačnou aktivitou endotelu je fibrinolýza, při které dochází k tvorbě plazminogenového aktivátoru (tPA) a inhibitorů plazminogenového aktivátoru (PAI-1,2) (11).

## **4. Interakce s buňkami krevního oběhu**

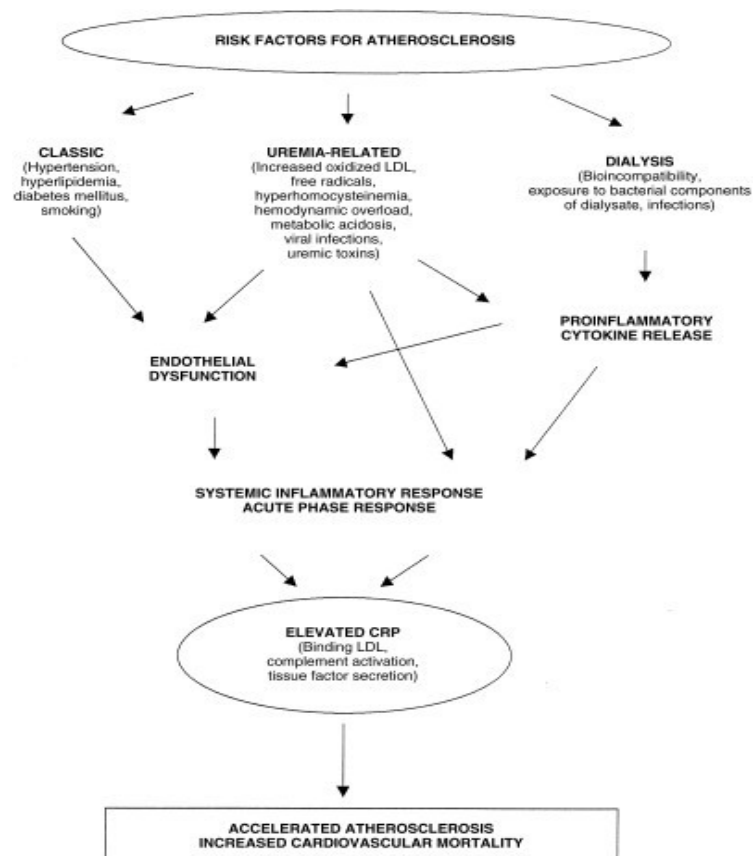
Mezi látky, které mají vliv na interakci s buňkami krevního oběhu patří E-selektin, ICAM-1 - intercelulární buněčná adhezivní molekula a VCAM-1 - vaskulární buněčná adhezivní molekula. Tyto molekuly se na povrchu endotelu za běžných (fyziologických) vyskytují jen v omezeném množství. Když dojde k aktivaci endotelu, zvýší se exprese těchto adhezivních molekul, což má za následek lepší průnik leukocytů do cévní stěny (11, 12).

## **5. Regulace permeability**

Další funkcí endotelu je tvorba polopropustné membrány mezi krevním řečištěm a cévní stěnou. Propustnost se zvyšuje v případě poškození endotelu. Tím dochází k prohloubení patologického stavu. Při endoteliální dysfunkci je typická zvýšená permeabilita pro monocyty a aterogenní lipidy. Tento proces vede k tvorbě zánětlivé reakce a vzniku aterosklerotického plátu (11).

### ***5.2 Endoteliální dysfunkce***

Endoteliální dysfunkce je stav kdy dochází k poruše funkce endotelu buď místně, nebo rozsáhle. Projevuje se zvýšenou permeabilitou stěny cév, dále nerovnováhou mezi působením vasokonstrikce a vasorelaxace, antikoagulačním a proagregačním účinkem, růst stimulujícími a růst inhibujícími faktory. Ve výsledku pak převládá **vasokonstrikce** (zvýšená produkce vasokonstriktorů endotelinu-1, acetylcholinu, tromboxanu A2 a angiotensinu II), **proliferace** (zvýšená proliferace hladkosvalových buněk) a **prokoagulace** (uvolnění velkého množství Von Willebrandova faktoru). Tyhle faktory mají proaterogenní účinek a vedou k rozvoji aterosklerózy. Z tohoto můžeme usuzovat, že právě endoteliální dysfunkce je počátkem rozvoje mnoha KVO jako jsou ICHS, hypertenze, diabetes mellitus, srdeční nedostatečnost nebo CMP. (13).



Obrázek 4: Rizikové faktory aterosklerózy

[http://www.nature.com/ki/journal/v59/n2/fig\\_tab/4492043f2.html](http://www.nature.com/ki/journal/v59/n2/fig_tab/4492043f2.html) (16. 4. 2013)

### **Farmakoterapie**

Mezi základní léčiva používaná k terapii endoteliální dysfunkce patří:

Hypolipidemika

ACE inhibitory

Blokátory kalciových kanálů

Estrogeny

Antioxidanty (14).



### **Nefarmakologická opatření**

Podstatou této léčby je úprava životního stylu a osobních návyků pacienta. Léčba není podpořená farmaky a je proto nutné, aby pacient sám měl zájem na zlepšení svého zdravotního stavu. Princip spočívá v eliminaci rizikových faktorů aterosklerózy. Samozřejmostí je přestat s kouřením, zvýšení fyzické aktivity (aerobní), snížení hmotnosti pacienta, úprava stravovacích návyků (příjem potravy s nižším obsahem tuků a cukrů). Výše uvedené opatření slouží také jako primární prevence rozvoje aterosklerózy (15).

## 6 Ateroskleróza

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění velkých a středních tepen (arterie dolních končetin, krkavice.) při kterém dochází k vzniku aterosklerotického plátu vlivem působení rizikových faktorů aterosklerózy.

Nadmnožinou aterosklerózy je arterioskleróza. Arteriosklerózu tedy můžeme rozdělit na tři podmnožiny:

Ateroskleróza

Arteriolskleróza

Mönckebergova medioklacinóza (16).

Jak je zmíněno výše ateroskleróza postihuje střední a velké tepny. Arteriolsklerózu pak nacházíme v malých artériích a arteriolách. Jsou typické pro pacienty s hypertenzí a diabetem mellitem, čili pacienty, kteří mají sklon k mikroangiopatiím. Pro arteriolsklerózu je typické zesílená cévní stěny a zúžení lumina, čímž může dojít k ischemii. Mönckebergova medioklacinóza je onemocnění, které se projevuje na horních a dolních končetinách. Tunica media těchto cév je kalcifikována a hyalinizována. Nedochází sice k zúžení průsvitu cévy, ale jejich pružnost je kvůli kalcifikaci značně omezena (16).

Ateroskleróza je typická u starších pacientů, avšak v mladším věku, okolo 20 let života, můžeme pozorovat změny, ke kterým dochází na cévách. Jsou to takzvané lipidní skvrny, které později přecházejí ve fibrózní pláty. Lipidní skvrny jsou viditelné pouhým okem. Později dochází ke kalcifikaci a vzniku aterosklerotického plátu (16).

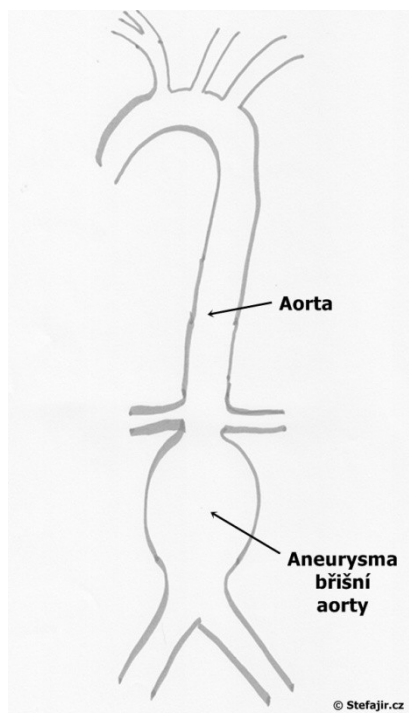
Dle lokalizace onemocnění rozlišujeme dva typy:

Aterosklerózu centrální

Aterosklerózu periferní

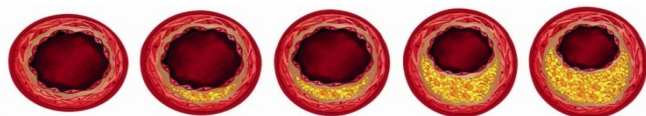
Centrální ateroskleróza je označení, které je platné pro změny nastávající v aortě. Postižení aorty je nejlépe viditelné v břišní oblasti. Podobně je tomu tak i u tepen dolních končetin. Významnou komplikací aterosklerózy je tvorba výdutě (Obrázek č.5). Ta vzniká na podkladě snížení pevnosti aorty. Vytvoří se tzv. aterosklerotické aneurysma, u kterého hrozí prasknutí (16).

Periferní ateroskleróza je typická pro věnčité, mozkové a ledvinové tepny. Na základě rozvoje aterosklerotického plátu tak dochází k ischemii orgánů, které jsou těmito tepnami zásobovány. Komplikace jsou pak příčinou mnoha úmrtí (16).



**Obrázek 5: Aneurysma břišní aorty**

<http://www.stefajir.cz/?q=aneurysma-aorty> (15. 4. 2013)



**Obrázek 6: Progrese aterosklerotických změn. Na obrázku můžeme vidět, jak se postupem času hromadí plak v tepně, což poukazuje na fakt, že ateroskleróza je progresivní onemocnění**

<http://www.multivu.com/mnr/60010-astrazeneca-atherosclerosis-education-american-heart-month> (15. 4. 2013)

## **6.1 Epidemiologie**

Epidemiologie aterosklerózy závisí na geografických podmínkách, věku, pohlaví a sociální postavení.

Ateroskleróza je typická pro vyspělé oblasti, jako je západní a střední Evropa, Severní Amerika. Japonsko, když je zemí vyspělou, s mezi rizikové oblasti nepočítá. Důvodem je vyšší konzumace ryb a snížený obsah tuku v potravě (17).

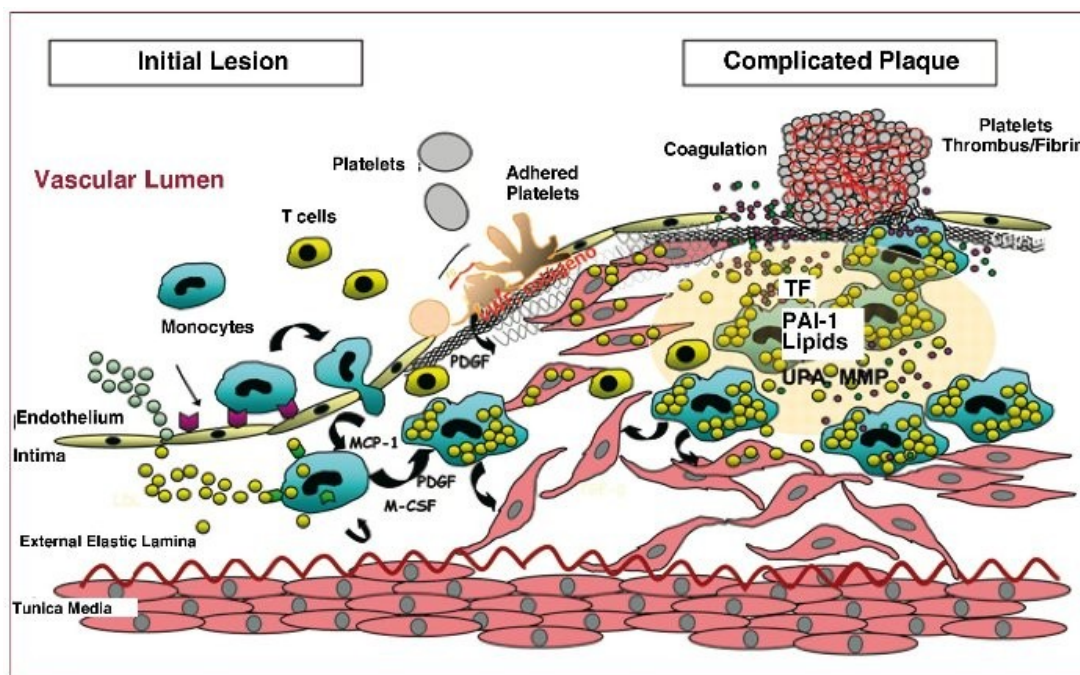
Ateroskleróza je častější u mužů než u žen. Ženy jsou do období menopauzy chráněny příznivým vlivem estrogenu, který snižuje hladinu LDL (low density lipoprotein) a zvyšuje hladiny HDL (high density lipoprotein) (2).

Jak už je uvedeno výše, manifestace aterosklerózy je častější ve vyšším věku, když změny na cévách pozorujeme již od 20 roku života.

I faktor jako je sociální postavení má svou roli. Bylo zjištěno, že u lidí ze sociálně slabších vrstev, je výskyt aterosklerózy frekventovanější (2).

## **6.2 Patogeneze**

Na patogenезi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnující rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny artérií jako odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech, jejíž příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze T-lymfocyty, monocyty a makrofágy z krve a hladkosvalové buňky z média. Dochází k postupnému rozpínání subendotelové vrstvy. Do tohoto prostoru pak pronikají lipoproteinové částice. Ty jsou podrobeny lipoperoxidaci, protože antioxidační působení endotelu je poškozeno. Vzniklý cholesterol je pohlcován makrofágy a dochází ke vzniku pěnových buněk. Prokoagulačním působením pak dochází ke vzniku ateromového plátu. Klinické příznaky se projeví, až když dojde k ruptuře obalu ateromového plátu, krvácení do plátu, vzniku trombu nebo embolu (18).



Obrázek 7: Patogeneze aterosklerózy

<http://www.revespcardiol.org/en/lipoproteins-platelets-and-atherothrombosis/articulo/13142654/> (17. 4. 2013)

### 6.2.1 Patogenní působení lipoproteinů

Lipoproteiny jsou základními transportéry cholesterolu a triacylglycerolu v krvi. Skládají se z jádra a obalu. Jádro je tvořeno hydrofobními částicemi, triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu. Okolo jádra se nachází obal, který je tvořen cholesterolem a fosfolipidy. Další složkou je apolipoprotein, což je bílkovina, která přenáší nerozpustný lipid krevním řečištěm. Lipoproteiny rozdělujeme dle density na:

- HDL (high density lipoprotein)
- LDL (low density lipoprotein)
- IDL (intermediate density lipoprotein)
- VLDL (very low density lipoprotein) (19).

Působením lipoproteinové lipázy na VLDL vznikají IDL a z nich pak LDL. Ty jsou pak navázány na LDL- receptory ve stěně artérií pomocí ApoB a ApoE. LDL-části jsou ve stěně cév oxidovány a vykovány. Tím vznikají částice, které jsou preferenčně vychytávány receptory monocytů a makrofágů. S rostoucím počtem

LDL částic se zvyšuje jejich koncentrace v monocitech a makrofázích, což vede k jejich transformaci na pěnové buňky (Obrázek č.8). Vznik pěnových buněk je součástí procesu rozvoje aterosklerózy. Z toho někteří usuzují, že právě hladina oxidovaného LDL je rozhodující pro nástup a pozdější progresi tohoto onemocnění (19, 20).

### **6.2.2 Patogenní působení endotelu**

Jak bylo uvedeno výše endotel, respektive aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce, hraje velkou roli v rozvoji vzniku aterosklerózy. Na aktivaci endotelu se podílí několik faktorů:

Oxidované LDL částice

Kouření

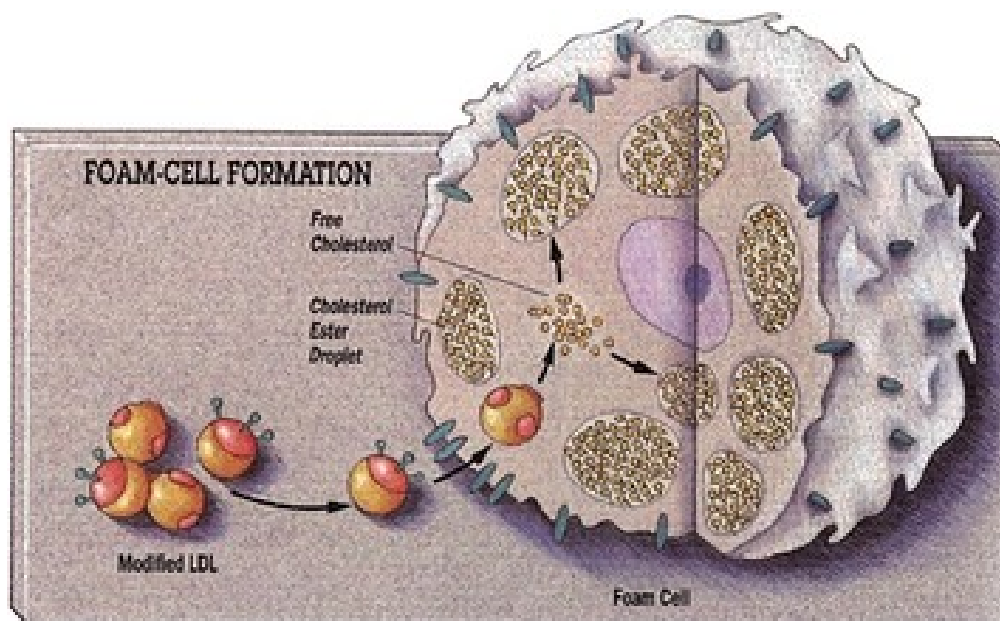
Hypertenze

Aktivovaný endotel mění svou funkci. Je propustný pro LDL částice, zvyšuje na svém povrchu expresi adhezivních molekul, jako jsou VCAM-1 a ICAM-1, snižuje se tvorba vasorelaxačního NO (dohází ke konstrikcí cév), zvyšuje se produkce prokoagulačních faktorů (Von Willebrandův faktor) (19, 20).

### **6.2.3 Patogenní působení monocytů a makrofágů**

Monocyty a makrofágy nacházíme ve všech aterosklerotických plátech. Monocyty dobře adherují k aktivovaným buňkám endotelu. Po prostupu do cévní stěny se monocyty přeměňují na makrofágy. Ty podporují tvorbu růstových faktorů a mediátorů zánětu. Mezi růstové faktory zařazujeme hlavně VEGF (vascular endothelial grow factor). Mediátory zánětu pak jsou IL-1(interleukin -1), IL-2 (interleukin-2), TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ ) a INF- $\gamma$  (interferon) (19).

Na povrchu makrofágů se nacházejí dva typy receptorů. Jedny jsou LDL-receptory, jejichž počet je ovlivňován množstvím LDL částic. Druhé jsou pak scavengerové receptory, které tímhle způsobem regulovány nejsou. Oxidovaná forma LDL lépe nasedá na receptory. Navazováním LDL částic na makrofágy dochází k přeměně makrofága na pěnovou buňku, které je součástí obsahu ateromového plátu (19).



Obrázek 8: Pěnová buňka

<http://www.charite.de/sysbio/research/foam/> (18. 4. 2013)

## 7 Myší model aterosklerózy

Vzhledem k tomu, že KVO je onemocnění, u kterého je v západní civilizaci zjištěna největší úmrtnost, snaží se vědci najít vhodný zvířecí model pro léčbu těchto onemocnění. Nejprve se používaly zvířecí modely králíků, prasat a opic. Králičí model se používal nejdéle. Jeho počátky se datují od roku 1908. U výzkumu na prasečím modelu se zjistilo, že při rozvoji aterosklerózy hrají roli monocyty. Vzhledem k tomu, že tyto tři modely (prase, králik a opice) jsou finančně nákladné a potřebují speciální zacházení, rozhodlo se od nich upustit, i když nám přinesly výsledky, kterých bychom se nemuseli dopátrat. Začal se hledat vhodnější zvířecí model. Od roku 1992 se jím stal model myši (21).

Ateroskleróza u myši se musí spustit zásahem zvenčí a to speciální stravou, které je obohacena cholesterolem. První taková dieta, která byla používána delší dobu, měla zastoupení:

Tuk 30%

Cholesterol 5%

Kyselinu cholovou 2%

Pomocí téhle diety se dala ateroskleróza přivodit u kmene C57BL/6. Problém ale spočinul v tom, že tahle dieta byla pro myši příliš toxická (21).

Další speciální strava (Paigenova) byla kvalitativně stejná, ale kvantitativně se lišila

Tuk 15%

Cholesterol 1,25%

Kyselina cholová 0,5%

Tato strava tvořila ložiska velmi malá a orientovaná hlavně v aortě. Tento model opět nebyl osvědčen jako model aterosklerózy, která se vyskytuje u lidí. Tyhle neúspěšné pokusy vedly vědce k tomu, že myš asi nebude vhodný kandidát na model aterosklerózy (22).

Od roku 1992 se myši začaly znovu požívat a to díky pokroku v genetickém inženýrství. Bylo objeveno, že Apolipoprotein E zodpovídá za přenos cholesterolu krví a taky slouží jako ligand, který se váže na receptory. Právě genovým inženýrstvím se deaktivoval gen, který je za expresi Apo-E zodpovědný. Tímto zásahem se podařilo vypěstovat Apo-E-deficientní kmeny myši (23).



U tohoto kmene bylo zjištěno, že množství cholesterolu v krevním řečišti je několika násobně vyšší (až 5x) než u kmenů myši, které tento gen potlačený nemají. Hladina HDL byla asi o ½ nižší než u normálního kmene, ale hladina TAG asi o 68% stoupla. Fenotyp Apo-E deficientních myši je shodný s lidským, čili se dá používat jako model, který slouží pro výzkum lidské aterosklerózy.

Zhruba do 6 týdne života dochází na endotelu ke zvýšené adhezi a transmigraci monocytů. Od 6 týden pozorujeme růst hladkosvalových buněk v médiu a tvorbu buněk pěnových, což vede k vytváření tukových proužků. Ty poměrně brzy začnou tvořit ložiska, která obsahují nekrotická jádra, matrix a hladkosvalové buňky. Na povrchu léze se utváří vazivová čepička, která bývá později kalcifikována.

Další strava (Western- type), která se začala používat při výzkumech, byla víc fyziologická. Složení je tentokrát jiné jak kvalitativně tak kvantitativně.

Tuk 21%

Cholesterol 0,15%

Kyselina cholová 0% (21, 22).

U normálních myších kmenů tato dieta vedla k dvojnásobně vyšší hladině cholesterolu v krvi a u Apo-E deficientních až k trojnásobnému vzrůstu. Ložiska u zvířat krměných touto stravou jsou po 5 týdnech 4-5x větší než u zvířat se stravou s nízkým obsahem tuků.(24).

Růst aterosklerotických plátů je u myši daleko rychlejší než u lidí, což má své výhody pro experimentální výzkum (24).

### **7.1 LDL-receptor deficientní kmeny**

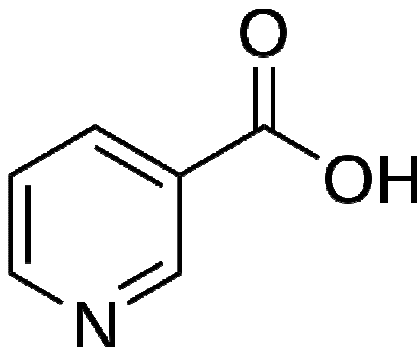
Roku 1993 byly vyvinuty LDL-receptor deficientní myši (LDLR-KO), které se používaly pro experimentální výzkum familiární hypercholesterolémie. Tímto se vytvořil zvířecí model, u kterého se ateroskleróza tvořila v závislosti na podávané dietě. Tyto myši byly později krměny Paigenovou dietou (tuk 15%, cholesterol 1,25%, kyselina cholová 0,5%), u které došlo k výraznému vzrůstu hladiny cholesterolu v plazmě a tvorbě aterosklerotických ložisek. Podávání nejméně toxické stravy (Western typy- tuk 21%, cholesterol 0,15%) vedla k tvorbě velkých lézí

aterosklerózy a hladiny cholesterolu v krvi byla asi 22,22 mmol/l. Tento model aterosklerózy není tak charakteristický jako u Apo-E deficientních myší (25).

## ***7.2 Apo-E deficientní a LDL-receptor deficientní kmeny***

Nedávno byly vyvinuty myší kmeny, které mají tzv. dvojí deficit. Jedná se o Apolipoprotein E-deficientní plus LDL-receptor deficientní (Apo-E/LDLr-DKO). Na standardní dietě byla u těchto myší prokazatelně viditelná přítomnost větších aterosklerotických plátů ve srovnání s Apo-E-deficientními myšmi. Z toho vyplývá že Apo-E/LDLr-DKO myši jsou velmi vhodné pro experimentální výzkum aterosklerózy (26).

## 8 Kyselina nikotinová



Obrázek 9: Vzorec kyseliny nikotinové

[http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Niacin\\_structure.svg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Niacin_structure.svg) (20. 4. 2013)

### 8.1 Mechanismus účinku

Ve fyziologických dávkách (20 mg/den) se používá jako vitamín, který brání rozvoji pelagry (proto také někdy nazýván vitamín PP-proti pelagrický). Hypolipidemický účinek kyseliny nikotinové se projevuje až v dávkách farmakologických (0,5-4,5 g/den), čili vyšších. Niacin je svým účinkem mezi hypolipidemik jedinečný tím, že snižuje hladiny LDL cholesterolu a zároveň významně zvyšuje hladiny HDL cholesterolu. Nedávno byly objeveny receptory pro kyselinu nikotinovou (GPR109A), které vedl k lepšímu pochopení mechanismu účinku. Kyselina nikotinová snižuje hladiny VLDL a tím i LDL (inhibicí lipolýzy tukové tkáně) a zvyšuje koncentrace HDL. Na základě klinických studií bylo prokázáno, že niacin snižuje kardiovaskulární mortalitu i morbiditu a taky celkovou mortalitu (27, 28).

### 8.2 Indikace

Kombinovaný přípravek ER niacin/laropiprant je určen k léčbě pacientů se smíšenou dyslipidemií a u pacientů s primární hypercholesterolemií, a to v kombinaci se statiny u těch jedinců, kde statiny samotné nejsou schopny upravit hladiny cholesterolu k žádoucím hodnotám. V monoterapii jej lze použít pouze u pacientů, u nichž je použití statinů nevhodné nebo kteří léčbu statiny netolerují. Během terapie je samozřejmě nutné pokračovat v režimových opatřeních, jako je

dieta, snižování hmotnosti a fyzická aktivita (29).

### **8.3 Nežádoucí účinky**

Nežádoucí účinky kyseliny nikotinové nejsou nijak životu nebezpečné, ale jsou pro pacient velmi nepříjemné. Jedním ze základních je tzv. flush – jedná se o vasodilataci v podkoží, které se projevuje zčervenáním, především tváří. Dochází k němu zvýšenou tvorbou prostaglandinu PDG2. Proto se niacinu dával do fixní kombinace spolu s laropiprantem, který je selektivním antagonistou pro tyto receptory. Dochází tak k výraznému snížení těchto nežádoucích projevů, aniž by docházelo k ovlivnění hladin lipidů. Mezi další nežádoucí účinky patří hepatotoxicita, která by se mohla zmírnit současným podáváním hepatoprotektiv a deteriorace homeostázy glukózy, čili dočasné narušení hladiny glukózy (28).

### **8.4 Extrahypolipidemické účinky**

Niacin se projevuje i jinými, než hypolipidemickými účinky. Zjistilo se antioxidační působení, dále aktivace PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gama) a antitrombotické účinky (29).

### **8.5 Kontraindikace**

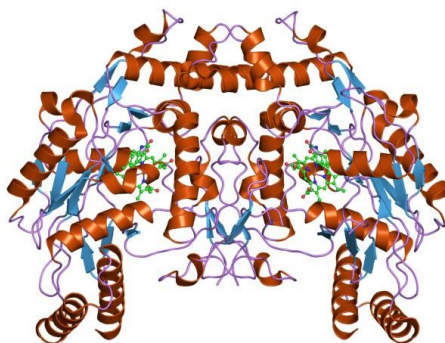
Přípravek je kontraindikován u pacientů s poruchou funkce jater. Dále by se měla brát ohleduplnost u osob požívající větší množství alkoholu a s postižením jater v anamnéze. Kyselina nikotinová se vylučuje ledvinami, takže při poruše funkce ledvin by měly být dávky sníženy nebo zvýšená opatrnost. Přípravek je kontraindikován u aktivní vředové choroby (29).

## 9 Endoteliální NO syntáza (eNOS)

Endoteliální NO syntáza je enzym, který je známý jako syntáza oxidu dusnatého (NOS3) nebo konstitutivní NOS (eNOS). eNOS hraje hlavní úlohu při syntéze NO buňkami endotelu. Oxid dusnatý, spolu s bradykininem, patří mezi hlavní vasorelaxační faktory cév. Při poruše endoteliální NO syntázy dochází k rozvoji endoteliální dysfunkce. Převládá působení faktorů vasokonstrikčních (tromboxan A<sub>2</sub>, acetylcholin a angiotensin II), což je jedna z hlavních příčin vedoucí k vzniku aterosklerózy (30).

Na pokles exprese endoteliální NO syntázy má vliv například cigaretový kouř. Bylo prokázáno, že cigaretový kouř má vliv na vznik endoteliální dysfunkce a proliferaci hladkosvalových buněk v tunica media (31).

Jako nezbytný aktivátor funkce eNOS působí endoglin (membránový glykoprotein, který se nachází ve dvou formách L- a S-endoglin, kdy L-forma snižuje expresi eNOS a S-endoglin expresi naopak zvyšuje) (30).



Obrázek 10: struktura eNOS

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/PDB\\_1m9j\\_EBI.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/PDB_1m9j_EBI.jpg)

## 10 Princip imunohistochemie

Principem imunohistochemie je vazba molekul imunoglobulinu s antigeny ve tkáni. Typy metod používaných v IHC:

Přímá metoda

Nepřímá dvoustupňová metoda (citlivější než přímá metoda)

Nepřímá trojstupňová (32).

**Přímá metoda-** primární protilátka je přímo označena fluoresceinem, kovem nebo enzymem (32, 33).

**Nepřímá dvoustupňová metoda-** na řezy se aplikuje neoznačená protilátka specifická proti prokazovanému antigenu ve tkáni. Na ni se pak nanáší protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinu zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka, která je specifická (32, 33).

**Nepřímá trojstupňová metoda-** V prvním kroku dochází k reakci specifické protilátky s antigenem ve tkáni a poté aplikujeme neznačenou protilátku proti imunoglobulinu zvířete, jehož protilátky používáme v první a třetí fázi (32, 33).

**Třetí krok: Metoda PAP nebo APAAP** – Nanáší se značený komplex PAP (peroxidáza anti peroxidázový komplex) nebo APAAP (alkalická fosfatáza anti alkalická fosfatáza)

**Metoda ABC (avidin-biotin komplex)-** je založená na tvorbě pevné ireverzibilní vazby mezi avidinem a biotinem.

Avidin- bílkovina vaječného bílku

Biotin- vitamín H (32, 33).

## 11 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 11.1 Cíl práce, zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo nastavit metodiku na detekci exprese eNOS v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica. Sledovali jsme také případné změny exprese eNOS po podávání kyseliny nikotinové, přičemž studie byla koncipována jako pilotní experiment. Pro tyto účely jsme použili kmen apoE/LDL-receptor deficientních myši krmených specifickou dietou s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů, dále imunohistochemické a stereologické metody.

### 11.2 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu

#### *Zvířata a chov*

V této experimentální studii byly použity Apo-E/LDLR-/- myši samice ve věku 16 – 18 již existující aterosklerózou. Tyto myši byly chovány v místnostech o teplotě 22 – 25°C a s pravidelným denním cyklem, kde se po dvanácti hodinách střídá světlo a tma. Přístup k vodě a potravě měly volný.

Veškeré procesy, které se na myších prováděly, byly v souladu Guidelines for Animal Care and Treatment of the European Union a schváleny místní etickou komisí pro zvířata.

#### *Potrava*

Do dovršení 16 - 18 týdne života byly myši krmeny granulovanou stravou bez cholesterolu (Sniff M-Z Spezialdiäten GmbH; Soest, Germany). V 16 – 18 týdnů byly myši rozděleny na základě hmotnosti do skupin po 6 a byly krmeny upravenou (AIN-93G-based diets). LCHP skupina byla 8 týdnů krmena dietou AIN-93G s nízkým obsahem sacharidů a vysokým podílem proteinů. Skupině LCHP + kyselina nikotinová byla podávána nízko sacharidová a vysokou proteinová strava po dobu prvních 4 týdnů a následující 4 týdny LCHP-dieta + 1% kyseliny nikotinové. Z levé srdeční komory myši byly odebrány krevní vzorky, které byly vloženy do zkumavek, a centrifugovány, abychom získali sérum. Tyto vzorky byly zmrazeny při teplotě -

80°C a uloženy a do samotné analýzy. Pro zjištění celkového cholesterolu a jeho frakcí, LDL, HDL a triacylglyceroly byly použity kity (Horiba). Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách mmol/l.

### **11.3 Imunohistochemie (IHC)**

#### **11.3.1 Protilátky**

**Primární protilátka:** eNOS rabbit anti- mouse (Pharmlingen) ředěnou v PBS 1/100

**Sekundární protilátka:** goat anti-rabbit (ředěnou v PBS) 1/400 + mouse serum 2%

#### **11.3.2 Roztoky a činidla**

**PBS (phosphate buffer saline)-** složení zásobního roztoku:

80,0 g NaCl,  
2,0 g KCl,  
11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O nebo 10,21 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml Aqua bidestilata

pH upravené na 6,8

Zásobní roztok je 10x koncentrovanější než používané ředěné PBS.

**BSA (bovine serum albumin)**

5,0 g BSA  
95, 0 g ředěného PBS

Po jednom ml rozděleno a zmraženo.

#### **11.3.3 Postup práce při použití ABC metodiky**

Postup: před započítím vlastní reakce se řezy fixovaly při teplotě -20°C v acetonu v mrazáku po dobu 30 minut a následně jsme jen nechali na 20 minut osušit na vzduchu. Po uschnutí jsme 2x po 5 minutách opláchli řezy v PBS (pufr hydrogenfosforečnanových solí). Poté se na dobu 30 minut nanoslo 50μl „mléka“ (dry milk in PBS- 0,5g dry milk do 10g PBS). Po oplachu v PBS jsme nanosli 40μl anti-avidinu a nechalo se inkubovat 15 minut. Následoval oplach v PBS (2x5 minut) a inkubace se 40μl anti-biotinu dalších 15 minut. Tyto 3 kroky (mléko, anti-avidin a



anti-biotin jsou takzvané blokační krok, aby nedošlo k navázání protilátek všude ve tkáni. Po oplachu v PBS jsme nanесли 50 $\mu$ l první protilátky eNOS rabbit anti-mouse (Pharmlngen) ředěnou v BSA 1/100 a nechali inkubovat 1hodinu. Po hodině jsme opláchli v PBS (2x5 minut)a nanесли zase mléko na dobu 30 minut. Dalším krokem byla inkubace s 50 $\mu$ l sekundární protilátky goat anti-rabbit (ředěnou v PBS 1/400) + mouse serum 2% (8 dílů). Po inkubaci jsme provedli oplach v PBS na 5 minut. Dalším krokem bylo 15 minut v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 70 ml PBS)- tím došlo k blokaci tkáňové peroxidázy. Po oplachu (2x5 minut) v PBS jsme nanесли 50 $\mu$ l předem připraveného (30 minut) ABC komplexu Elite (5 $\mu$ l Avidinu + 5 $\mu$ l Biotinu do 250 $\mu$ l PBS) na dobu 30 minut. Po třiceti minutách následoval oplach v PBS (2x5 minut) a nanesení DABu (5 $\mu$ l DAB v 250  $\mu$ l buffer) přesně na 30 sekund! Následoval rychlý oplach v PBS a vložení sklíček do destilované vody. Na 5 vteřin jsme sklíčka nechali modrat v roztoku hematoxylinu a 1 minutu nechali pod tekoucí vodou, šetrně, tak ab proud neponičil tkáň. Nakonec jsme provedli odvodnění preparátů v acetonu a aceton-xylenové řadě. V acetonu jen krátký oplach a po třech minutách aceton-xylen (10:1) a aceton-xylen (1:10) nakonec po jedné minutě 3x jen do xylenu. Sklíčka jsme montovali Eukitem.

## **11.4 Stereologická analýza**

Kvantifikace endoteliální exprese eNOS byla provedena prostřednictvím stereologických metod. Po nakrájení série o 100 řezech síly 7  $\mu\text{m}$  se z referenčního objemu řezy systematicky náhodně vybraly. Pro každé barvení se první řez vybral náhodně, potom byl vybrán každý dvanáctý řez. Tím pádem osm barvených řezů se použilo ke stereologickému hodnocení. Použila se metody bodové testovací mřížky, ta se volila tak, aby bylo napočítáno přes 100 průsečíků mezi body sítě a barvením na eNOS barvením na jednu z cév. Odhadovaná barvená plocha se vypočítala dle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde  $a$  je plocha odpovídající 1 testovacímu bodu,  $P$  znamená počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení (34).

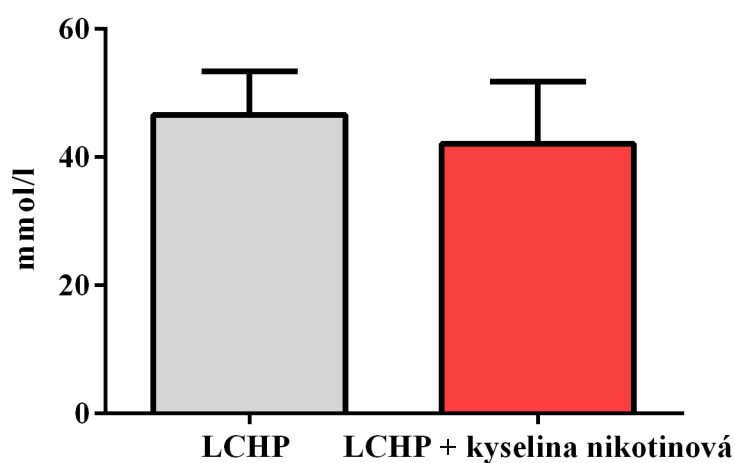
## **11.5 Statistická analýza**

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro osm myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila t-testem za použití softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc; San Diego, California, USA).  $P$  hodnoty 0,05 nebo menší byly považovány za statisticky významné.

## 12 VÝSLEDKY

### 12.1 Biochemická analýza

Biochemickou analýzou byla určena hladina celkového cholesterolu u myší. Podáváním kyseliny nikotinové nedošlo k významným rozdílům mezi hladinami cholesterolu těchto dvou skupin ( $46,61 \pm 6,24$  mmol/l a  $42,11 \pm 8,82$  mmol/l, viz graf č. 1).

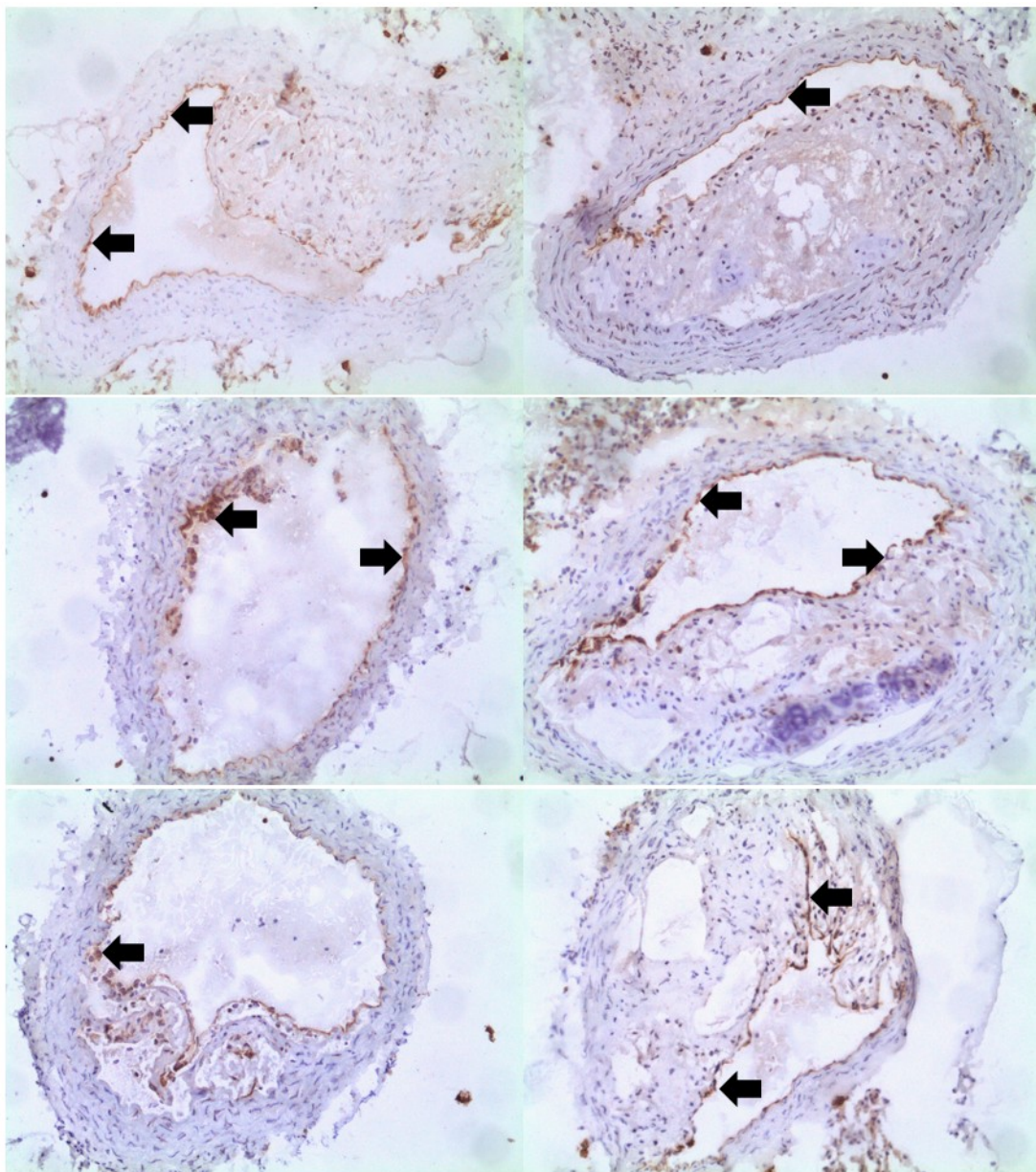


**Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší.**

*Čtyřtýdenní podávání nikotinové kyseliny statisticky významně neovlivnilo hladiny celkové koncentrace cholesterolu, v porovnání s kontrolní skupinou myší ( $p = 0,3762$ ).*

### 12.2 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická detekce eNOS byla provedena u obou skupin (LCHP a LCHP + kyselina nikotinová) na 96 sklíčkách. Expres eNOS byla nalezena u obou skupin a všech jejich zástupců. Viditelná byla pouze na endotelu cév. Expres eNOS se vyskytovala hlavně na endotelu aterosklerotických plátů, i v místech, kde se pláty nenacházely. Zásadní rozdíly v expresi eNOS mezi skupinami LCHP a LCHP + kyselina nikotinová jsme nepozorovali.

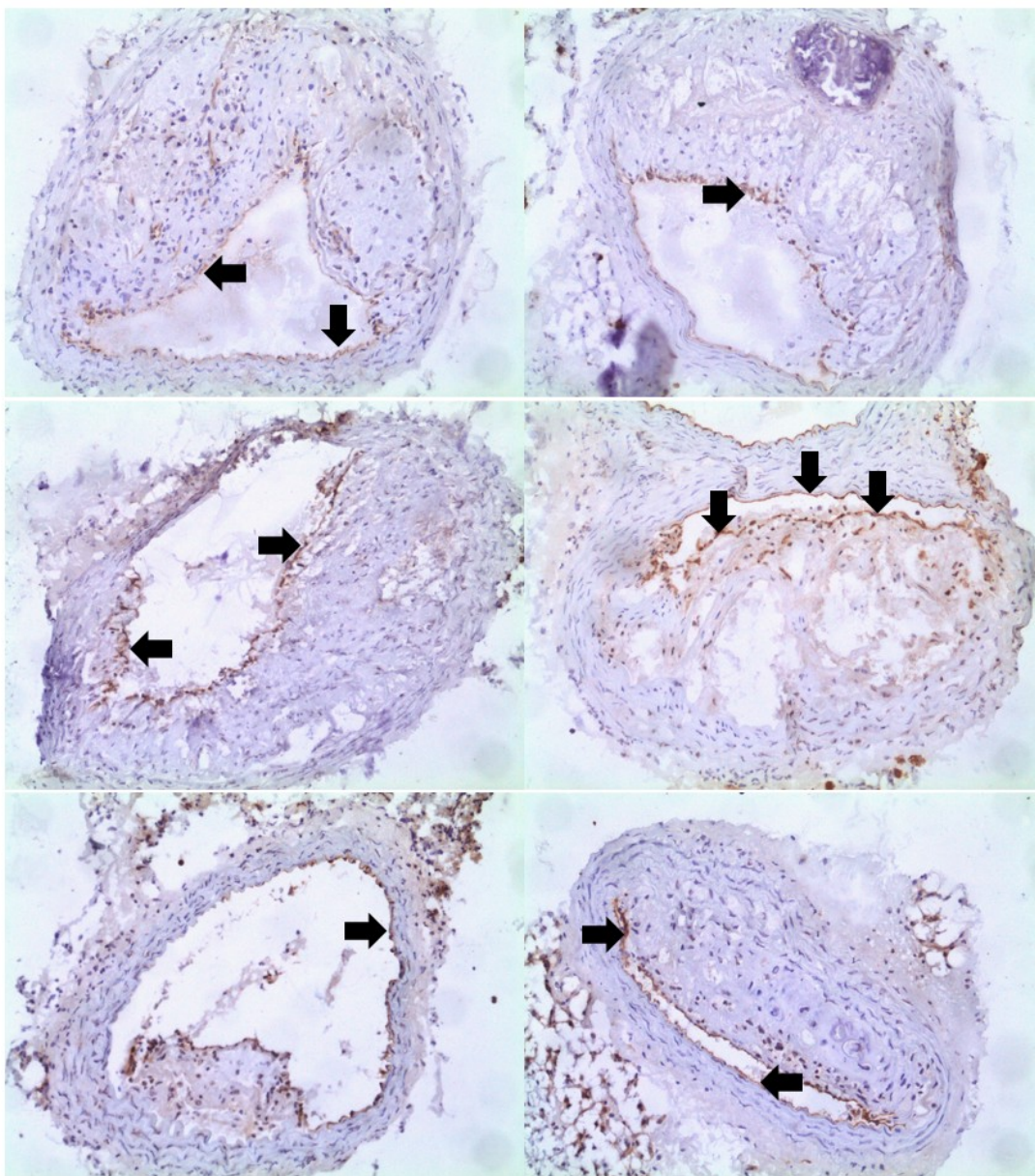


**Obrázek 11: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS u skupiny LCHP.**

*Hnědá barva znamená pozitivní reakci na eNOS (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.*

*Zvětšení 100x.*



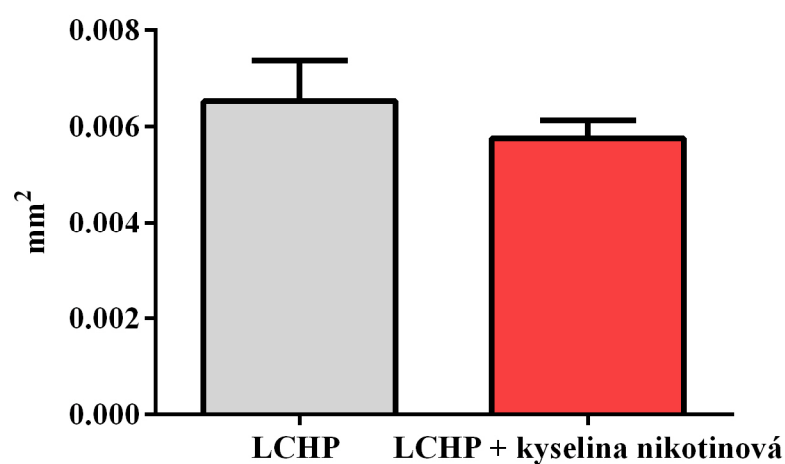


**Obrázek 12: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS u skupiny LCHP + nikotinová kyselina.**

*Hnědá barva znamená pozitivní reakci na eNOS (šípky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.  
Zvětšení 100x.*

### 12.3 Stereologická analýza exprese eNOS v arteria brachiocephalica

Stereologická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly v expresi eNOS u myší, kterým byla podávána LCHP dieta, ve srovnání se skupinou kde byla přidávána nikotinová kyselina ( $0,0065 \pm 0,00034 \text{ mm}^2$  vs  $0,0058 \pm 0,00015 \text{ mm}^2$ , (viz Graf 2).



*Graf 2: Stereologická analýza exprese eNOS v arteria brachiocephalica.*

*Podávání LCHP diety s přidavkem kyseliny nikotinové nevedlo k signifikantnímu ovlivnění exprese eNOS oproti LCHP skupině ( $p = 0,0811$ ).*

## 13 DISKUSE

Ateroskleróza je dnes považována za hlavního činitele v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou onemocnění periferních cév, mrtvice nebo ICHS. Patologie aterosklerózy je velmi komplexní onemocnění a zahrnuje prvky cévní stěny, krevních destiček, leukocytů a zánětlivých buněk, jako jsou monocyty a makrofágy. Endotel tvoří rozhraní mezi stěnou cévy a mezi buňkami krve (výše zmíněné). Endoteliální dysfunkce tedy hraje hlavní roli v rozvoji aterosklerózy. Lze tedy konstatovat, že obecně platí, že snížení exprese eNOS vede ke snížení tvorby NO a k rozvoji endoteliální dysfunkce (35).

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit expresi eNOS v arteria brachiocephalica u myši se stravou s nízkým obsahem sacharidů a vysokým obsahem proteinů (LCHP), která byla navržena jako více aterogenní a prozánětlivá oproti tzv. „western type“ dietě. Kromě toho jsme chtěli posoudit účinek působení kyseliny nikotinové. Tato práce je považována za pilotní studii, protože zatím nebyly publikovány žádné studie se zaměřením na LCHP, kyselinu nikotinovou a eNOS (36).

Ve studii jsme použili APO-E/ LDLR- deficientní myši, které slouží jako dobrý zvířecí model pro studium aterosklerózy (37). U těchto myši se ateroskleróza a hypercholesterolémie rozvíjí jak spontánně, tak s ohledem na stravu. V této práci byly použity myši, které byly krmeny LCHP stravou, která se prokázala jako vysoce aterogenní i v porovnání s dalšími typy diet (36).

V této práci jsme neprokázali hypolipidemický účinek kyseliny nikotinové, i když je známo, že kyselina nikotinová má silný vliv na snižování hladiny LDL a zvyšování hladiny HDL cholesterolu (38). V této fázi nevíme, zda je za neúspěch odpovědná velikost podávané dávky nebo krátká doba podávání kyseliny nikotinové.

Některé studie ukázaly, že kyselina nikotinová je schopná ovlivnit prozánětlivé markery, včetně C-reaktivního proteinu (CRP), adiponektinu a MCP-1 bez účinku hypolipidemického (39, 40).

V této diplomové práci jsme studovali expresi eNOS v arteria brachiocephalica, což je céva kde se vyskytují i velmi pokročilé stádia aterogeneze. I

přes skutečnost, že aortální sinus je referenčním místem pro studium aterosklerózy myší, v arteria brachiocephalica můžeme léze a ruptury plátu lépe pozorovat (41). Pro kvantifikaci exprese eNOS byly použity imunohistochemické a stereologické metody. Výsledky těchto analýz neprokázaly žádné významné změny v expresi eNOS na endotelu arteria brachiocephalica, což poukazuje na to, že podávání kyseliny nikotinové neovlivnilo jeden ze zásadních markerů, který je důležitý pro zlepšení funkce endotelu.

Vzhledem k tomu že je tato studie pilotní tak není známo, proč selhala léčba kyselinou nikotinovou jak v protizánětlivém, tak v hypolipidemickém účinku. Protože neexistují žádné poznatky ze studie účinku kyseliny nikotinové v pokročilém stavu aterosklerózy v arteria brachiocephalica, zdá se být nezbytné změnit design studie.



## 14 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit způsoby jak detekovat expresi eNOS v arteria brachiocephalica u myší, které byly rozděleny do dvou skupin podle stravy. Jedna skupina byla krmena LCHP a druhá LCHP + kyselina nikotinová.

Kyselina nikotinová neovlivnila hladinu cholesterolu oproti kontrolní skupině (LCHP).

Imunohistochemická a stereologická analýza neukázala statisticky významné rozdíly mezi endoteliální expresí eNOS po léčbě kyselinou nikotinovou a u myší, které kyselinou nikotinovou léčeny nebyly.

Výsledky prezentované v této diplomové práci neukazují žádný účinek kyseliny nikotinové na rozvoj aterosklerózy, což poukazuje na fakt, že bude nutné změnit experimentální design studie (potravu, denní režim) abychom zjistili, jestli má kyselina nikotinová protizánětlivé účinky a účinky na progresi léze v tomto experimentálním modelu.

## 15 Seznam zkratek

APAAP - alkalická fosfatáza anti alkalická fosfatáza

ApoB – apolipoprotein B

ApoE - apolipoprotein E

Apo-E/LDLR-DKO - apolipoprotein E-deficientní plus LDL-receptor deficientní

BSA – bovinní sérový albumin

CMP – cévní mozková příhoda

CRP – C-reaktivní protein

DAB – diaminobenzidín

eNOS – endoteliální NO syntáza

HDL – lipoproteiny o vysoké denzitě

ICAM-1 – intracelulární buňčné adhezivní molekuly

IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor

IHC – imunohistochemie

ICHDK – ischemická choroba dolních končetin

ICHS – ischemická choroba srdeční

IL – interleukiny

LDL – lipoproteiny o střední denzitě

INF- $\gamma$  – interferon gama

KVO – kardiovaskulární onemocnění

LDL – lipoproteiny o nízké denzitě

LDLR-KO – LDL-receptor deficientní

LCHP – nízkosacharaidová a vysokoproteinová dieta

ABC – avidin-biotin komplex

MCP-1 – monocytární chemotaktický protein

MMP -metaloproteinázy

NO – oxid dusnatý

PAI 1,2 –inhibitor plazminogenového aktivátoru

PAP – peroxidáza anti peroxidázový komplex

PBS – pufr hydrogenfosforečnanových solí

PDG-2 – prostaglandin

PDGF – růstový faktor tvořený destičkami

PGI-2 – prostacyklin

PP – proti pelagrický

PPAR- $\gamma$  – peroxizom proliferátor aktivované receptory

SEM – střední chyba průměru

TAG – triacylglyceroly

TF – tkáňový faktor

TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor alfa

tPA – plazminogenový aktivátor

UPA – urokináza plazminogenový aktivátor

VCAM-1 – vaskulární buněčné adhezivní molekuly

VEGF – vaskulární růstový faktor endoglinu

VLDL – lipoproteiny o velmi nízké denzitě

WHO – světová zdravotnická organizace

## 16 Seznam použité literatury

1. Zemřelí 2011, *ÚZIS* [online], [cit. 2013-04-15], dostupné z: <http://uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/zemreli>.
2. Vlček, J., Fialová, D. a kol., *Klinická farmacie I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, ISBN 978-80-247-3169-8.
3. Příčiny kardiovaskulárních onemocnění, [online], [cit. 2013-04-16], dostupné z: <http://www.med.muni.cz/centrumprevence/informace-pro-vas/rizika-nemoci/6-priciny-kardiovaskularnich-onemocneni.html>.
4. George, S. a Johnson, J. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanismus*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2010, [ s. 3-5.] ISBN 978-3-527-32448-4.
5. Paulsen, D.F., *Histologie a buněčná biologie*, 1. vydání, Nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o., 2004, [s. 158-162], ISBN 80-73190-24-9.
6. Čihák, R., *Anatomie 3*. 1. Vydání, Grada Publishing a.s., 1997, [s. 69-71], ISBN 80-7169-140-2.
7. MedAtlas, [online], [cit. 2013-04-17], dostupné z: [http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas\\_2/MA\\_txt1-2-3-2.htm](http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/MA_txt1-2-3-2.htm).
8. Konrádová, V., Uhlík, J. a Vajner, L. *Funkční histologie*, 2. vydání, Nakladatelství H&H, 2000, [s. 120-121], ISBN 80-86022-80-3.
9. Histologie, [online], [cit. 2013-04-20], dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/obeh-ho.pdf>.
10. Histologie a embryologie, [online], [cit. 2013-04-15], dostupné z: [http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/histologie/doc/Skripta\\_00.pdf](http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/histologie/doc/Skripta_00.pdf).
11. Bell, D.M., Johns, T.E., Lopez, L.M., *Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases*, Ann Pharmacother, 1998, [ s.459-470].
12. Blann, A.D., Taberner, D.A., *Reliable Marker of Endothelial Cell Dysfunction: Does It Exist?*, British Journal of Haematology, 1995, [s. 244-248].
13. De Caterina, R., *Endothelial dysfunctions:common denominators in vascular disease*, Current Opinions in Lipidology, 2000, [s. 9-23].

14. Bultas, J., Karetová, D., *Endoteliální dysfunkce, aterogeneze a možnosti farmakologického ovlivnění*, Remedia, 6, 1998, [s. 366-380].
15. Martínková, J., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2007, [s. 213-215], ISBN: 978-80-247-1356-4.
16. Mačák, J. a Mačáková, J., *Patologie*, 1. Vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 171], ISBN 80-247-0785-3.
17. Povýšil, C., Šteiner, I., et al., *Speciální patologie: patologie oběhového ústrojí*, 2. vydání, Galén, 2007, [s. 430], ISBN 978-80-7262-494-2.
18. Žák, A., a kol., *Ateroskleróza- Nové pohledy*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2011, [s. 19-26], ISBN 978-80-247-3052-3.
19. Silbernagl, S., Lang, F., a kol., *Atlas patofyziologie člověka*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2001, [s. 236-239], ISBN 80-7169-968-3.
20. Atero, [online], [cit. 2013-04-15], dostupné z: <http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf>.
21. Liao, F., Andalibi, A., Debet, F. C., Fogelman, A. M., Lysis, A. J., *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*, 1993, [s. 2572-9].
22. Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., Holmes, P., *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*, 1985, [s. 57- 65].
23. Mahley, R.W., Weisgraber, K. H., *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function*, 1984, roč. 25, č. 12, [s. 1277-94],
24. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*, 1994, roč. 14, č. 1, [s. 133-140].
25. Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L., Brown, M. S., *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins*, 1994, [s. 4431-35].
26. Stráský Z., Večeřová, L., Rathouská, J., Slanařová, M., Brčáková, E., Kudláčková, Z., Andrys, C., Micuda, S., Nachtigal, P., *Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice*, 2011, [s.1747-55].

27. Gille, A., Bodor, E.T., Ahmed, K., Offermanns, S., *Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanism of action*, 2008, [s. 79-106].
28. Kyselina nikotinová lék neprávem opomíjený, [online], [cit 2013-04-18], dostupné z: [http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-clanek/kyselina-nikotinova-lek-nepravem-opomijeny-3158?confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-clanek/kyselina-nikotinova-lek-nepravem-opomijeny-3158?confirm_rules=1).
29. Fixní kombinace ER niacin/laropirant, [online], [cit. 2013-04-14], dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profily/Fixni-kombinace-ER-niacin-laropirant/6-I-VI.magarticle.aspx>.
30. Nachtigal, P., Večeřová, L., Rathouská, J., Stráský, Z., *The role of endoglin in atherosclerosis*, 2012, [s. 4-11], [PubMed - as supplied by publisher].
31. Ferrer, E., et al., *Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig*, 2009, [s. 10].
32. Imunohistochemie, [online], [cit. 2013-04-21], dostupné z : [http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/12\\_Imunohistochemie.pdf](http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/12_Imunohistochemie.pdf).
33. ABCAM: IHC paraffin staining protocol, [online], [cit. 2013-04-21], dostupné z : <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11384>.
34. Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P., Zadak, Z., *Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis*, 2004, [s. 219-29].
35. Sessa, W. C., *eNOS at a glance*, 2004, [s. 2427-9].
36. Kostogrys, R. B., Franczyk-Zarow, M., Maslak, E., Gajda, M., Mateuszuk, L., Jackson, C. L., Chlopicki, S., *Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-))*, 2012, [s. 327-31].
37. Coleman, R., Hayek, T., Keidar, S., & Aviram, M., *A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice*, 2006, [s. 415-24].
38. Ruparel, N., Digby, J. E., Choudhury, R. P., *Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function*, 2011, [s. 66-70].
39. Yu, B. L., Zhao, S. P., *An atherosclerosis beyond its lipid-altering effects*, 2007, [s. 90-4].

40. Borges, J. L., *Drug combinations: statins and niacin*, 2005, [s. 36-41].
41. Bond, A. R., Jackson, C. L., *The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture*, 2001, [s. 399-406].